ZUR BIOCHEMISCHEN CHARAKTERISIERUNG UND DARSTELLUNG VON MURINEM LSP UND KSP

Blumenstingl Johann

Diss
Minden
1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546827_0029

Aus der Medizinischen Klinik 2 im Klinikum Großhadern
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. G. Paumgartner

ZUR BIOCHEMISCHEN CHARAKTERISIERUNG UND DARSTELLUNG VON MURINEM LSP UND KSP

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Blumenstingl Johann

aus Straubing

München 1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. D. Jüngst
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. G. Paumgartner
Dekan:	Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 2. August 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS Seite

1.	Einleitung	1
1.1	Literaturübersicht	1
1.2	Problemstellung	12
2.	Material und Methodik	13
2.1	Material	13
2.2	Materialgewinnung	13
2.3	Verarbeitung von Leber und Nieren	14
2.4	Präparation von LSP bzw. KSP nach Mc Farlane	15
2.5	Proteinbestimmung	16
2.6	Lipiddünnschichtchromatographie	17
2.7	Cholesterolbestimmung	18
2.8	Neutralfettbestimmung	19
2.9	Bestimmung der unveresterten (freien) Fettsäuren	20
2.10	Phospholipidbestimmung	22
2.10.1	Bestimmung der Gesamtphospholipide	22
2.10.2	Qualitative Auftrennung der Phospholipide	23
2.10.3	Quantitative Bestimmung der Phospholipidfraktionen	23
2.11	Kohlenhydrataffinitätschromatographie	24
2.11.1	Chromatographie mit dem Gesamtkomplex LSP bzw. KSP	24
2.11.2	SDS-Chromatographie	25

2.12 Gradientenultrazentrifugation 25

2.13 SDS-Polyacrylamidelektrophorese 26

2.14 Elektronenmikroskopie 27

3. Ergebnisse 28

3.1 Gelchromatographie 28

3.1.1 Säuleneichung 28

3.1.2 Gelchromatographie von LSP 29

3.1.3 Gelchromatographie von KSP 30

3.2 Protein- und Lipidanalytik 31

3.2.1 Biochemische Zusammensetzung von LSP 31

3.2.2 Biochemische Zusammensetzung von KSP 35

3.3 Kohlenhydrataffinitätschromatographie 39

3.3.1 LSP 39

3.3.2 KSP 41

3.4 Gradientenultrazentrifugation 43

3.4.1 LSP 43

3.4.2 KSP 44

3.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese 45

3.5.1 LSP 45

3.5.2 KSP-SDS-PAGE 46

3.6 Elektronenmikroskopie 47

3.6.1 LSP 47

3.6.2 KSP 48

4. Diskussion und Vergleich 49

4.1 Methodik 49

4.2 LSP 52

4.3 KSP 57

5. Zusammenfassung 63

Tabellarischer Überblick 65

6. Literaturübersicht 66

1. Einleitung

1.1 Literaturübersicht

Seitdem 1938 Claude [1] die Zentrifugation zur Isolierung der einzelnen Zellfraktionen eingeführt hatte, wurde es möglich, bei Gewebehomogenisaten die einzelnen Fraktionen jeweils getrennt, z. B. auch nach ihrer immunbiologischen Spezifität (Perlmann et al [2], 1958; D'Amielo & Perlmann [3], 1960; Vogt [4], 1960; Dumonde [5], 1966) zu untersuchen.

Dörner et al [6] beschrieben dann 1962 ein "Leberspezifisches Protein" in der löslichen Phase der Zellfraktionen. Meyer zum Büschenfelde [7] konnte 1966 ein ähnliches, lösliches, leberspezifisches Protein beschreiben, das zu besonderer klinischer Bedeutung gelangte. Meyer z. B. und Schuhmacher [8,9,10] konnten nämlich 1968 Antikörper gegen dieses Protein in Seren von Patienten nachweisen, die an chronischer Hepatitis erkrankt waren. Die klinische Bedeutung dieses löslichen Leberantigens wuchs, als Kössling und Meyer z. B. 1968 [11] und 1970 [12] in Cryo-

statschnitten von Leberbiopsien (von Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis) Zellen darstellten, die spezifisch mit dem Antikörper gegen dieses Leberprotein reagierten. Schließlich konnten sie [11,12] auch experimentell eine Autoimmunhepatitis in Kaninchen erzeugen, indem sie diese mit dem menschlichen Leber-Protein immunisierten.

Meyer z. B. trennte 1972 [13] dieses lösliche Leberantigen mittels Gelchromatographie in zwei Komponenten auf; in ein hochmolekulares Lipoprotein (das HLP, was Human-Liver-Protein bedeutete, bzw. das LP-I genannt wurde, weil es bei der Gelfiltration als erstes "Liver-Protein" erschien) und in ein 190 000 Dalton schweres cytoplasmatisches Protein (LP-II).

In ihrer Arbeit von 1972 wurden sich Meyer z. B. et al [14] nicht schlüssig, welche Komponente hauptsächlich für die Autoimmunvorgänge verantwortlich sei. In den weiteren Jahren konnte beispielsweise von Behrens [15] gezeigt werden, daß beide in Tests zu Autoimmunphänomenen bei Lebererkrankungen positiv reagierten.

Das hochmolekulare Lipoprotein, das dann vor allem

in der englischsprachigen Literatur (z. B. Mc Farlane et al [16]) als LSP (Liver-specific-protein) bezeichnet wurde, zeigte sowohl in mehreren zellulär vermittelten Immunreaktionen, wie Leukozyten-Migrations-Inhibiting-Assay, Lymphozyten-Stimulations-Assay und Zytotoxizitäts-Assay (Zusammenstellung siehe 17), als auch in humoral vermittelten Immunreaktionen [17] positive Reaktionen.
So fand Manns [18] bei 27 von 62 Patienten mit chronischen Lebererkrankungen (unabhängig vom HBs-Ag-Status); bei 9 von 16, die eine chronisch persistierende Hepatitis (wiederum HBs-Ag positiv als auch negativ) hatten; in 7 von 18 Fällen bei akuter HBs-Ag positiver viraler Hepatitis; in 7 von 15 Fällen bei akuter HBs-Ag negativer viraler Hepatitis; bei 2 von 8 Patienten mit HBs-Ag negativer Leberzirrhose; in 4 von 14 Patienten bei alkoholinduzierten Lebererkrankungen und in 6 von 56 Fällen bei primär nichthepatitischen Autoimmunerkrankungen (ohne klinische Leberbeteiligung) Autoantikörper gegen humanes LSP mittels doppelten Antikörperradioimmunopräzipitations-Assay. Ähnliche Zahlenverhältnisse berichtete auch Kakum et al [19]. Manns et al [20] fanden 1981, daß bei akuter und chronischer NonA-nonB-Hepatitis

LSP-Antikörper relativ selten gefunden werden.

Das Auftreten positiver Immunphänomene ließ allerdings die Frage der pathophysiologischen Rolle, die dem LSP zukommen könnte, noch offen. Wie bereits erwähnt, konnte Kössling und Meyer z. B. [11,12] experimentell mit Human-LSP bei Kaninchen eine Autoimmunhepatitis erzeugen. Und Thomson et al [21] zeigten 1974, daß Lymphozyten von Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis auf Kaninchenleberzellkulturen zytotoxisch wirkten, wobei diese Zytotoxizitätsreaktion durch kleine Mengen an LSP verhindert werden konnte. Trotzdem erklärte dies die Frage noch nicht, wann und wodurch LSP Auslöser oder auch nur Verstärker von Autoimmunphänomenen wird.
Die geläufigste These dazu sei kurz dargestellt: Durch eine akut, subakut oder chronisch auftretende Noxe, z. B. Hepatitis-B-Virus-Infektion, kommt es zu Änderungen der Zellmembranoberflächen und ihrer antigenen Struktur, womit nun LSP, das als Membranbestandteil anzusehen ist, für die oben erwähnten Immunreaktionen als Antigen wirken kann [17,22]. Durch zytotoxische, antikörperabhängige Immunmechanismen, vor allem vom zellulären Typ, wobei LSP als Zielantigen wirkt, werden die Leberzellen zerstört [23,24]. Dieser Zustand ist normalerweise

aber nur vorübergehender Natur. Kommt es nun zu einer Störung im Zusammenwirken der humoralen und zellulären Immunsysteme, so daß der nötige "feed-back" nicht mehr funktioniert, kann sich der Autoimmunprozeß perpetuieren und die akute Erkrankung wird zur chronischen. Die Störung kann nach Eddlestone et al [25] in einem Defekt oder Mangel an Suppressor-T-Lymphozyten liegen, wodurch B-Lymphozyten weiterhin Antikörper gegen LSP produzieren und somit im Zusammenwirken antikörperabhängiger zellulärer Immunreaktionen die Leberzellen weiter schädigen.

Auch Tsantoulas et al [26] stellten 1980 die These auf, daß die LSP-Immunreaktionen ursprünglich nicht im primär kausalpathogenetischen Sinne der Erkrankung zu sehen seien, sondern erst sekundär durch ihre Perpetuierung zur weiteren Schädigung führten. Klinisch meinte er damit das entzündlich-chronische Stadium, das an der Leber schließlich zur Zirrhose führen kann.

Den Beweis für die immunpathogenetische Rolle des LSP bei den chronischen autoimmunologischen Leber-erkrankungen sah Meyer z. B. [24] ex juvantibus in der erfolgreichen immunsuppressiven Therapie. Außerdem wies er [24] auf die sich ergebende diagnostische Bedeutung hin: So lassen sich lebermembranspezifi-

sche Antikörper (z. B. LSP) mittels indirekten Immunfluoreszenztests an isolierten Kaninchenhepatozyten nachweisen und damit Hinweise auf Erkrankungen erhalten, die in einem hohen Prozentsatz, wie z. B. die HBs-Ag-negative chronische autoimmunologische Hepatitis, mit diesem Testansatz reagieren.
Diese diagnostische Bedeutung hob 1977 auch schon Tage-Jensen [27] hervor und sah die zellvermittelte Immunität gegen LSP und vor allem das Auftreten von LMA (Autoantikörper gegen Lebermembranen) als spezifisch für die primär autoimmunologischen Lebererkrankungen an.

Schon 1968 diskutierte Meyer z. B. [10] über die Organspezifität von LSP, da er bei immunologischen Tests zum Teil auch positive Reaktionen gegen KSP (dem zu LSP entsprechenden Organextrakt aus der Niere) und sogar gegen Schilddrüsengewebsextrakt fand. 1972 berichtete er [13] von einem Antiserum gegen KSP, das auch schwach mit LSP reagierte.
Mc Farlane [16] stellte dagegen 1977 bei Ouchterlony-Immundiffusionstests mittels spezifischer Antiseren gegen LSP und KSP keine gemeinsame Antigenität zwischen den beiden Organextrakten fest. Im Gegensatz dazu betonte Behrens et al [28], daß ihr Anti-LSP-Serum sowohl gegen LSP als auch gegen KSP prä-

zipitierte, ohne daß es jedoch mit Serumbestandteilen reagiert hätte. Das Anti-KSP-Serum lieferte ebenfalls mit den beiden Extrakten Präzipitationslinien. Außerdem zeigten sie [28], daß Anti-LSP- und Anti-KSP-Seren mit Extrakten aus glatter Muskulatur, Schilddrüsenfollikel, Darm und Milz reagierten. 1979 testeten Behrens et al [15] mit einem antikörperabhängigen Zytotoxizitäts-Assay die Organspezifizität von LSP und KSP und kamen ebenfalls zu Kreuzreaktionen zwischen den beiden. Sie vermuteten, daß dieses Phänomen durch ein gemeinsames Antigen von Leber- und Nierenmembranen zustande käme, wobei LSP und KSP auch noch organspezifische Antigene besäßen und abhängig von der Art und Weise der Immunisierung und Testung jeweils unterschiedliche Antigenstrukturen der Zellmembranen zur Geltung kommen. Manns et al [18] stellten ihr Ergebnis von 1980 ebenfalls unter dem Gesichtspunkt der Mehrfachantigenität der beiden Substanzen dar und führten z. B. aus, daß die Seren von Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis in 10 Prozent und in 7 Prozent bei alkoholinduzierten Lebererkrankungen sowohl mit Anti-LSP als auch mit Anti-KSP im Radioimmunopräzipitations-Assay reagierten. Schließlich stellten Manns et al [18] die These auf, daß die

Antikörper gegen LSP in menschlichen Seren hauptsächlich auf die organspezifische Komponente gerichtet seien. Darin betonen sie auch ausdrücklich, der gegenwärtige Stand der Antigenpräparation von LSP, wie er von Mc Farlane beschrieben wurde [16], läßt es nicht zu, LSP als eine einzige Entität zu beschreiben, womit die Möglichkeit von nicht organspezifischen Verunreinigungen beinhaltet sei.

1980 veröffentlichte Mc Farlane [29], gestützt auf eigene Befunde und auf Meyer z. B. [30], daß LM-Ag (liver membrane antigen) 2 Antigenkomponenten besitzt, und eins davon sei gemeinsam mit LSP. Die andere Antigenkomponente könnte sich in verunreinigtem LSP-Material befinden, während sie in hochgereinigtem Material nicht zu finden sei. Außerdem vertrat Meyer z. B. [30] die Auffassung, das LSP und LM-Ag gemeinsame Antigen sei auch wahrscheinlich der immunologische Partner bei den chronisch entzündlichen Lebererkrankungen.

Schon 1968 hatte Meyer z. B. [8] die Speziesunabhängigkeit (zumindest antigenmäßig) erwähnt. Auch Behrens [28] betonte, daß sie bei ihren Untersuchungen fast identische biochemische Ergebnisse bei Verwen-

dung murinen statt menschlichen Materials erhalten habe. Manns et al [18,31,32] führten ausgedehntere Studien über die Frage der Speziesspezifität durch und kamen zu dem Schluß, daß die speziesunspezifische Komponente doch wohl die immunologische Determinante für das LSP bezüglich der autoimmunologischen Selbstperpetuierung bei den Lebererkrankungen sei. Auch Hopf [33] äußerte sich in diesem Sinne; er benutzte für seine Studien Sprague-Dawley-Ratten.

Über die biochemischen Eigenschaften von LSP und KSP sowie über deren Charakterisierung sind - abgesehen vom immunologischen Aspekt - nicht allzuviele und übereinstimmende Daten bekannt. Bevor es Mc Farlane [16] 1977 gelang, LSP und KSP in stabiler Form, vor allem in Anwesenheit eines Tris/EDTA-Puffers, zu isolieren, war die Stabilität des (antigenen) Materials nur für ein paar Tage gewährleistet [13]. Während Meyer z. B. [13] noch mit zwei Säulenläufen (Sephadex G-100 und dann dem ersten Peak über eine Sephadex G-200) arbeitete, gelang es Mc Farlane [16], ein kürzeres Präparationsverfahren (nur über eine Sepharose 6-B-Säule) anzugeben, wenn man "LP-II" nicht benötigte. Die Qualität war bestechend, da er immunologisch

keine Serumbestandteile mit Ausnahme von Albumin nachweisen konnte. Dieser Albuminanteil, den er auf bis zu zwei Prozent bezifferte, schien vielmehr Bestandteil als Verunreinigung zu sein, da er trotz mehrerer Reinigungsverfahren nicht vom Lipoproteinkomplex des LSP zu trennen war. Dieser Albuminanteil konnte von anderen Autoren, wie z. B. von Behrens [28], nicht bestätigt werden.

Schon aus den Ergebnissen von Meyer z. B. [13] (1972) ging hervor, daß LSP und KSP hochmolekulare Komplexe waren. Als aber Mc Farlane [16] 1977 zeigen konnte, daß die beiden Moleküle im "void-volume" seiner Sepharose 4-B-Säule erschienen, mußte ein Molekulargewicht von über 20 Millionen Dalton angenommen werden.

1974 gelang es Hopf et al [33], mit einer indirekten Immunfluoreszenzmethode an isolierten Hepatozyten die Zellmembranlokalisation von LSP aufzuzeigen.

Auch Lebwohl [34] entdeckte 1981 in einer negative-staining Elektronenmikroskopaufnahme Membranstrukturen, die auf die Membranherkunft des LSP hinwiesen.

Schon 1972 sprach Meyer z. B. [13] von einem membrangebundenen Lipoprotein, das sehr viele Phospholipide enthalten sollte. Auch Mc Farlane [29] beschrieb

1980 Phospholipide und Triglyzeride als Bestandteile, wobei er 1977 [16] das Phospholipid/Proteinverhältnis auf 0,48 bezifferte. Lebwohl [34] errechnete in seiner Arbeit aus dem Jahre 1981 ein Gesamtlipid/Proteinverhältnis im Bereich von 0,24 - 1,09. Hütteroth [17] beschrieb 1978 ein phospholipid- (mit Cephalinen, Sphingomyelin, Lecithin, Lysolecithin) und triglyzeridreiches LSP. Bei seiner Einzelanalysenaufstellung in der selben Arbeit gab er eine Zusammensetzung von 1,9 g/100 ml Protein, Gesamtcholesterol von 8 mg/100 ml, Triglyzeride von 293 mg/100 ml und 28 mg/100 ml Phospholipide an. Diese Angaben stehen in Widerspruch zu seinen eigenen Feststellungen, wie auch zu denen von Mc Farlane [29] und Meyer z.B. [13]. Einen prozentualen Anteil von weniger als 1,5 Prozent kann man kaum als phospholipidreich beziffern!

SDS-Polyacrylamidelektrophoresen sind von Lebwohl [34], Mc Farlane [16], Hütteroth [17] und Behrens [28] beschrieben worden. Aber nur die Bandenmuster von Behrens wurden entsprechend ihren Molekulargewichten klassifiziert, wodurch für LSP und KSP acht Banden ähnlicher Molekulargewichte festgestellt werden konnten. Mc Farlane fand bis zu 13 und Hütteroth bis zu

14 reproduzierbare Banden, währenddessen Lebwohl für LSP kein einheitliches Bandenmuster erkennen konnte.

Meyer z. B. [13] charakterisierte schon 1972 LSP und KSP als Low-Density-Lipoproteine, da sie sich in der Dichtezentrifugation so verhielten, ohne jedoch explizit Werte anzugeben. Behrens [28] beschrieb für LSP eine Dichte von 1,147 g/cm^3 und für KSP denselben Wert. Manns et al [31] fanden 1982 mittels 125-Jod markiertem LSP im Cs-Cl-Gradienten zwei Radioaktivitätsgipfel, den einen zwischen 1,11 und 1,14 und den anderen von 1,32 - 1,34. Für KSP teilten sie eine ähnliche Verteilung mit.

1.2 Problemstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die eingehendere biochemische Charakterisierung und Darstellung von LSP und KSP sowie ihr gegenseitiger Vergleich. Desweiteren sollten die gefundenen Daten mit den bisherigen widersprüchlichen Literaturangaben verglichen werden, um für weitere Arbeiten sowohl biochemischer als auch immunologischer Art das dazu notwendige Grundgerüst wohlfundierter biochemischer Fakten zu liefern. Die Untersuchungen sollten möglichst so ausgeführt werden, daß

das Problem der Materialbeschaffung keine wesentlichen Einbußen an Qualität und Quantität mit sich brachte. Da schon Mc Farlane [16] 1977 die Probleme des rapiden Materialverfalls durch Autolyse bei Organentnahmen aus menschlichen Leichen ansprach und die Speziesunspezifität des zu untersuchenden Materials bekannt ist, wurde hier tierisches Material (LSP und KSP aus Ratten) benutzt, das sofort nach dem Tod des Tieres zur Verfügung steht.

2. Material und Methodik

2.1 Material

Es wurden die Leber und Nieren von 150 g schweren, weißen, männlichen Sprague-Dawley-Ratten (bezogen von der Fa. Ivan Novas) verwendet.

2.2 Materialgewinnung

Die Ratten wurden nach einem kurzen Schlag auf den Kopf mit einem speziellen Gerät dekapitiert, die Bauchhöhle eröffnet und die Leber sowie beide Nieren entnommen.

2.3 Verarbeitung von Leber und Nieren

Die Materialverarbeitung erfolgte hauptsächlich so, wie sie von Mc Farlane [16] und Behrens [28] beschrieben worden ist.

Sofort nach Entnahme der Leber bzw. der Nieren wurden sie in einer eisgekühlten Waschlösung (0,25 M Saccharose mit 1 M Tris auf ph 8 eingestellt) von 4 °C in kleine Stücke zerschnitten und 5 Stunden bei halbstündlichem Wechsel der Lösung gewaschen. Dabei wurden ca. 10 Lebern bzw. 20 Nieren gepoolt.

Unter Eiskühlung wurde das Probenmaterial anschließend bei einem Verhältnis von Gewebe/Waschlösung (wt/vol) von 1:1 mit einem Ultra-Turrax (Fa. Janke & Kunkel) 3 mal 5 sec. zerkleinert, wodurch ein sahneartiger Gewebebrei entstand. Daraufhin setzte man den Gewebebrei, ebenfalls unter Eiskühlung, in einem Potter-Homogenizer (Braun-Melsungen) 3 mal bei 1200 U/min in einem Borsilikatglas mit Teflonstempel den Scherkräften aus.

Das nun entstandene Homogenat wurde in einem 60-Ti-Rotor (Beckmann) in der Ultrazentrifuge 1 h bei 4 °C und 100 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt, mit 200 IU/ml Peni-

cillin und 10 µg/ml Gentamycin versetzt und in 8 ml Portionen im Gefrierschrank bei - 70 °C aufbewahrt.

2.4 Präparation von LSP bzw. KSP nach Mc Farlane [16]

Nachdem die Probe langsam in kaltem Wasser aufgetaut war, wurde sie nochmals bei 20 000 g 20 min in einem SW-50-Rotor (Beckmann) in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Vom Überstand vermischte man 4 ml 30 min in einem automatischen Rotator mit 100 µl ^{3}H-Cholesterol (1,2-^{3}H(N)-Cholesterol, NET 139), entsprechend 1 µCi. Das radioaktiv markierte Gemisch wurde auf eine Glassäule von 95 x 3,0 cm, gefüllt mit Bio-Gel A-15 M 200 - 400 mesh (Bio-rad), aufgetragen und mit einem Tris/EDTA-Puffer (0,1 M Tris; 0,2 M NaCl; 0,1 mM EDTA und mit HCl auf ph 8 eingestellt), unter einem hydrostatischen Druck von 30 cm Wassersäule eluiert. Mit einem Fraktionssammler (Fa. LKB, Typ 7000 Ultrorac) wurde das Eluat zu Fraktionen von 140 Tropfen (entsprechend 8,4 ml) gesammelt und in einem Spektralphotometer (Fa. Beckmann, Model 24) bei 280 nm die Extinktionen der Fraktionen bestimmt. Außerdem wurde von jeder Fraktion 100 µl mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Fa. Roth, Rotiscint 22)

versetzt und im β-Kanal des Betaszint 5000 die Counts/min bestimmt.
Der erste Peak der graphischen Darstellung der Fraktionen (photometrisch und radioaktivitätsmäßig) wurde gepoolt und mit einer Amicon-Ultrafiltrationsrührzelle über eine XM-300 Membran (der Fa. Diaflo; Durchmesser 4,3 cm), bei einem Druck von 1 atm (15 psi) auf ca. 10 % des Ausgangsvolumens eingeengt.
Dies war das Ausgangsmaterial für die weitere Analytik und wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder wieder bei - 70 ^{o} C aufbewahrt.

2.5 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry [35], wobei ein Kupfer-Proteinkomplex in alkalischer Lösung gebildet wird, der ein Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagenz (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz) reduziert und dadurch eine Blaufärbung entsteht.
Die Extinktion des Farbkomplexes wurde beim 750 nm bestimmt.
Zu 100 µl Probenmaterial, das vorher in einem "Visking"-Dialysierschlauch (Fa. Serva, Heidelberg) gegen Aqua bidest. dialysiert wurde, wurden 1 ml 0,5 N NaOH

(mit 10 % Na_2CO_3; 0,05 % $CuSO_4$; 0,1 % Kaliumtartrat) in das Reagenzröhrchen pipettiert, auf einen Whirlmix durchgemischt und 15 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurden 3 ml 10 % Folin-Reagenz (Fa. Merck) zugegeben und sofort kräftig durchgemischt. Nach 45 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 750 nm gegen Wasser bestimmt.
Die Bestimmung der Konzentrationen erfolgte durch Vergleich der Extinktionen mit denen einer Standardreihe, die 10, 25, 50, 100, 200 und 400 mg/dl Rinderalbumin enthielt, und als Eichkurve graphisch dargestellt wurde.

2.6 Lipiddünnschichtchromatographie [36]

Zur qualitativen Dünnschichtchromatographie der Lipidfraktionen wurde 0,1 ml Probenmaterial mit 1,0 ml H_2O versetzt, die Lipide mit 8 ml Chloroform/Methanol 3:1 extrahiert und 5 ml der Chloroformphase mit N_2 abgedampft. Der getrocknete Rückstand wurde in 0,1 ml Chloroform wieder gelöst und auf eine Kieselgel-Dünnschichtchromatographieplatte (DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F-254; 20 x 20 cm; Fa. Merck) aufgetragen und als Fließ-

mittel Petrolbenzin/Diethyläther/Eisessig 90:10:1 verwendet. Mit Joddampf wurde das Verteilungsmuster der einzelnen Lipidfraktionen angefärbt.

2.7 Cholesterolbestimmung

Das Gesamtcholesterin wurde mit der CHOD-Pap-Methode [37,38] mittels Testansatz der Fa. Boehringer Mannheim bestimmt.

Cholesterin (Cholesterinester werden mit einer Cholesterinesterase gespalten) wird mit einer Cholesterinoxidase oxidiert und das entstehende H_2O_2 ergibt zusammen mit 4-Aminophenazon und Phenol nach Zugabe einer Peroxidase 4-(p-Benzochinonmonoimino)-phenazon, das bei 546 nm aufgrund seiner Absorption gemessen werden kann.

Hierzu wurden 30 ml der gebrauchsfertigen Lösung 1 (0,4 M Kaliumphosphatpuffer, ph 7,7; 20 mM Phenol; 1,85 M Methanol) mit 30 ml der Lösung 2 (0,4 M Kaliumphosphatpuffer, ph 7,7; 2 mM 4-Aminophenazon; 1,85 M Methanol; 0,4 % Hydroxypolyäthoxydodecan) und mit 0,3 ml der Lösung 3 (Cholesterinoxidase $\geq$ 12 U/ml; Cholesterinesterase $\geq$ 40 U/ml; Peroxidase $\geq$ 8 U/ml) vermischt. Von dieser Mischung wurden 1 ml mit 100 µl Probenmaterial 30 min bei Raumtemperatur

inkubiert und anschließend die Extinktion bei 546 nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen.
Die Bestimmung der Konzentrationen in mg/dl erfolgte durch Vergleich der Extinktionen mit denen einer Standardreihe, die 5, 10, 20 und 40 mg/dl Cholesterin enthielt, und als Eichkurve graphisch dargestellt wurde.

2.8 Neutralfettbestimmung

Die Neutralfettbestimmung erfolgte mit einem vollenzymatischen UV-Test [39] der Fa. Boehringer Mannheim.
Triglyzeride spalten mittels Lipase/Esterase Glyzerin ab, das mit ATP nach Zugabe von Glyzerokinase ADP ergibt, welches mit Phosphoenolpyruvat und Pyruvatkinase Pyruvat ergibt. Dieses Pyruvat wird zusammen mit $NADH/H^+$ durch Lactatdehydrogenase in Lactat und NAD^+ umgewandelt. Die Extinktion des NAD^+ bei 365 nm ist ein Maß für die Konzentration der Triglyzeride.
Hierzu wurden 75 ml der gebrauchsfertigen Lösung 1 (20 mM Phosphatpuffer, ph 7,7; 4 mM Magnesiumsulfat; 0,35 mM Natrium-Dodecylsulfat) mit 1,5 ml der Lösung 2 ($NADH/H^+$ 10 mM; ATP 22 mM; PEP 18 mM) und

1,5 ml der Lösung 3 (LDH $\geq$ 300 U/ml; PK $\geq$ 50 U/ml; Lipase $\geq$ 4 000 U/ml; Esterase $\geq$ 30 U/ml) vermischt. Von dieser Mischung wurden 1 ml mit 100 µl Probenmaterial 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion E_1 bei 365 nm bestimmt. Anschließend wurden 10 µl Glyzerokinase ($\geq$ 150 U/ml) zugefügt, vermischt und nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur die Extinktion E_2 bei 365 nm gemessen. Durch Subtraktion von E_2 und E_{R1} (R1 = Reagenzienleerwert) von E_1 erhält man ΔE.
Die Bestimmung der Konzentrationen in mg/dl erfolgte durch Vergleich der Extinktionen mit denen einer Standardreihe, die 10, 20, 50 und 100 mg/dl Triglyzeride enthielt, und als Eichkurve graphisch dargestellt wurde.

2.9 Bestimmung der unveresterten (freien) Fettsäuren

Die Bestimmung der unveresterten freien Fettsäuren erfolgte mit einem enzymatischen/colorimetrischen Testansatz (NEFA C-Test Wako) der Firma Wako Chemicals (Osaka, Japan) nach der ACS-ACOD-Methode [40].
Freie, unveresterte Fettsäuren werden mittels Acyl-CoA-Synthetase in Gegenwart von CoA und ATP acyliert. Das so entstandene Acyl-CoA wird durch Acyl-

CoA-Oxidase oxidiert, und es werden 2,3-trans-enoyl-CoA und H_2O_2 gebildet. Dieses H_2O_2 läßt 3-methyl-N-ethyl-N-(β-hydroxyethyl)-anillin mit 4-aminoantipyrin zu einem roten Farbstoff mittels einer Peroxidase oxidativ kondensieren. Der rote Farbstoff kann dann bei 546 nm colorimetrisch bestimmt werden.
50 µl (LSP) bzw. 100 µl (KSP) werden mit 1 ml der gebrauchsfertigen Lösung A (Acyl-CoA-Synthetase, CoA, ATP und 4-Aminoantipyrin in 0,05 M Phosphatpuffer, ph 6,9; der Triton X-100 enthält) für 10 min bei 37 ^{o} C inkubiert und anschließend werden 2 ml der Lösung B zugegeben (Acyl-CoA-Oxidase, Peroxidase und 3-Methyl-N-ethyl-N-(β-hydroxyethyl)-anilin in 0,05 M Phosphatpuffer mit 0,1 % Triton X-100). Nach weiteren 10 min Inkubation bei 37 ^{o} C wird die Extinktion bei 546 nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Die Bestimmung der Konzentrationen in mg/dl erfolgte durch Vergleich der Extinktionen mit denen einer Standardreihe, die 10, 25 und 50 mg/dl Palmitinsäure enthielt, und als Eichkurve graphisch dargestellt wurde.

2.10 Phospholipidbestimmung

2.10.1 Bestimmung der Gesamtphospholipide

Zur Bestimmung der Gesamtphospholipide nach Fiske-Subbarow [41] wurde aus 0,1 ml Probenmaterial mittels Chloroform (wie in 2.6) die Lipidfraktion extrahiert und mit N_2 abgedampft. Der getrocknete, mit 1 ml H_2O und 0,5 ml 10 N H_2SO_4 wieder aufgelöste Rückstand wurde für 3 h bei 150 °C inkubiert. Anschließend wurden ein paar Tropfen Perhydrol zugegeben, kräftig geschüttelt und wieder bei 150 °C für 1,5 h inkubiert. Nach erfolgter Abkühlung wurden 4,5 ml 0,22 % Ammoniumheptamolybdatlösung und 0,2 ml Fiske-Subbarow-Reagenz (6,85 g Natriumdisulfit und 0,125 g 1-Amino-2-hydroxy-naphtaleinsulfonsäure in 50 ml H_2O gelöst, anschließend mit ein paar Tropfen 30 % Natriumsulfitlösung titriert, bis die Trübung verschwand) zugegeben, gemischt, und für 7 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach erfolgter Abkühlung wurde die Absorption des entstandenen Farbkomplexes bei 830 nm gemessen.
Die konzentration der Gesamtphospholipide erhielt man durch Vergleich mit den Extinktionen einer Standardreihe, die 10, 25, 50, 75, 100, 200 nmol/l Phos-

phat (entsprechend 9, 22,5, 45, 67,5, 90 und 180 mg/dl Phospholipide) enthielt, und als Eichkurve graphisch dargestellt wurde.

2.10.2 Qualitative Auftrennung der Phospholipide

Die qualitative Auftrennung der Phospholipide erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie [42]. Dazu wurde der getrocknete Lipidextrakt (wie in 2.6) wieder in 100 µl Chloroform/Methanol/Wasser 2:1:3 aufgelöst und auf eine Kieselgel-Dünnschichtchromatographieplatte (DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F-254; Fa. Merck) aufgetragen. Als Fließmittel wurde $CHCl_3$/Methanol/H_2O 65:35:8 benutzt. Die Banden wurden mit Phosphormolybdänsäure (Molybdatophosphorsäure-Sprühreagenz 3,5 % der Fa. Merck) und anschließender Erhitzung auf 150 ^{o} C für 15 min im Trockenofen angefärbt.

2.10.3 Quantitative Bestimmung der Phospholipidfraktionen

Zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Phospholipidfraktionen wurde die Lipidfraktion wie in 2.10.2 extrahiert (mit Einsatz von 0,5 ml Probenmaterial) und nach der Trocknung wieder in 280 µl Chloroform/

Methanol/Wasser 2:1:3 aufgelöst und auf eine Kieselgeldünnschichtchromatographieplatte (wie in 2.10.2) aufgetragen. Die nach erfolgter Verteilung mit Jod angefärbten Banden wurden mit dem Spatel jeweils einzeln vorsichtig abgekratzt und die darin enthaltenen Phospholipidkomponenten wie in 2.10.1 quantitativ bestimmt.

2.11 Kohlenhydrataffinitätschromatographie

Zum Nachweis von Kohlenhydraten wurde die Affinitätschromatographie [43] mittels Con A-Sepharose (Fa. Pharmacia) herangezogen.

2.11.1 Chromatographie mit dem Gesamtkomplex LSP bzw. KSP

Eine Pasteurpipette wurde mit Con A-Sepharose (Gelbett 5,5 mm x 55 mm) gefüllt. 0,1 ml Probenmaterial, das ja noch radioaktiv markiert war, wurden auf die Säule aufgetragen. Als Elutionspuffer für ungebundene Substanzen wurde ein Tris/NaCl-Puffer (0,02 M Tris/HCl; 0,15 M NaCl; ph 7,5) verwendet und Fraktionen zu 1 ml eluiert. Eventuell gebundenes Material sollte durch Zusatz von 0,5 M Methyl-α-Glucopyranosid zu dem Tris/NaCl-Puffer in Fraktionen zu ebenfalls 1 ml eluiert werden.

Der Nachweis der Substanz erfolgte durch Bestimmung der Extinktion bei 280 nm und der Radioaktivität von 0,1 ml der Fraktionen in 5 ml Szintillationsflüssigkeit.

2.11.2 SDS-Chromatographie

200 µl Probenmaterial wurden mit 2 % SDS und 4 % Mercaptoäthanol versetzt und 3 min auf 95 °C erhitzt und anschließend in einem Visking-Dialysierschlauch gegen 1 % SDS/Phosphatpuffer (0,5 M $NaHPO_4$; 0,5 M $NaPO_4$; 1 % SDS) dialysiert. Mit diesem SDS/Phosphat-Puffer wurden die ungebundenen Substanzen in 8 Fraktionen zu 1 ml eluiert, während die eventuell gebundenen Substanzen durch Zusatz von 0,5 M Methyl-α-glucopyranosid zu dem SDS/Phosphatpuffer in 9 Fraktionen zu 1 ml eluiert werden sollten. Der Nachweis der Substanz erfolgte durch Bestimmung der Extinktionen im Lowry-Test, wozu 0,5 ml der Fraktionen eingesetzt wurde.

2.12 Gradientenultrazentrifugation

1 ml Probenmaterial, das ja noch radioaktiv markiert war, wurde mit 3,4 ml CsCl-Lösung (Ausgangsdichte 1,25 g/cm^3) 72 h bei 4 °C und 50 000 U/min in einer

Beckmann Ultrazentrifuge mit einem SW 60 Rotor einer isopyknischen Ultrazentrifugation [44] ausgesetzt. Der Dichtegradient wurde anschließend in 11 Fraktionen zu 0,4 ml abpipettiert, die Extinktionen bei 280 nm und die Radioaktivität von 0,1 ml der Fraktionen in 5 ml Szintillationsflüssigkeit gemessen. Die Dichtebestimmung erfolgte durch Abwiegen von 0,1 ml der Fraktionen auf einer Präzisionswaage.

2.13 SDS-Polyacrylamidelektrophorese

Die SDS-Poyacrylamidelektrophorese wurde nach dem Prinzip der horizontalen Ultradünnschicht-SDS-Porengradienten-Gelen [45] durchgeführt. Dazu wurde das Probenmaterial 3 min bei 95 ^{o} C in einem 0,0375 M Tris/HCl-Puffer, der 1 % SDS und 4 % Mercaptoäthanol bei ph 8,8 enthielt, inkubiert. Als Gel wurde ein ultradünnes (0,36 mm) SDS-Polyacrylamidgel mit einem konkaven exponentiellen Porengradienten (T = 4 - 22,5 %; Glycerin = 3,3 - 18,75 %) auf eine PAG-Folie (Fa. LKB) gegossen. Eine 0,375 M Trislösung (mit 14 % Glycerin; 0,1 % SDS; 0,001 % NaN_3; ph 8,3) wurde als Kathodenpuffer und eine 0,375 M Trislösung (mit 3,3 % Glycerin; 0,1 % SDS; 0,001 % NaN_3; ph 8,3) als Anodenpuffer verwendet. Die Laufbedingungen betrugen für die Spannung 600 V, für die Stromstärke 50 mA, für die Leistung 30 W und für die Zeit 1,5 h. Nach der 30 min Fixie-

rung in 20 % Trichloressigsäure wurde das Gel 3 x 1/2 h in einer Lösung, die 50 % Methanol, 10 % Eisessig und 40 % H_2O enthielt, gewaschen. Anschliessend wurde es in 3,2 mM Salpetersäure, die 0,1 g Kaliumdichromat auf 100 ml beinhaltete, eine halbe Stunde oxidiert. Für weitere fünf Minuten wurde das Gel in 0,5 % Silbernitratlösung (Silberfärbung [45]) gelegt. Nachher reduzierte man mit 20 % Natriumcarbonat, das 0,250 % Formaldehyd enthielt. Die Reaktion wurde mit 5 % Essigsäure gestoppt.

2.14 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde im negative-staining Verfahren [46] mit 2 % Phosphorwolframsäure durchgeführt. Das verwendete Elektronenmikroskop war vom Typ 101 der Firma Siemens. Die Vergrößerung betrug 60 000. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten im Institut für Diabetesforschung München-Schwabing in der Abteilung für Elektronenmikroskopie unter Leitung von Herrn PD Dr. E. Siess.

3. Ergebnisse

3.1 Gelchromatographie

3.1.1 Säuleneichung

Die Eichung der Säule zur Bestimmung des "void volume" erfolgte mit den hochmolekularen Bestandteilen von Dextran 5 000 (Fa. Serva, Heidelberg), das einen Molekulargewichtsbereich bis zu 40 Millionen Dalton umfaßt. Der erste Peak der graphischen Darstellung der Extinktionen der Fraktionen bei 280 nm repräsentiert jene Fraktionen, deren Molekulargewicht 15 Millionen Dalton (entsprechend dem Ausschlußmolekulargewicht von Bio Gel A-15 M) überschreitet. Siehe Abb. 1.

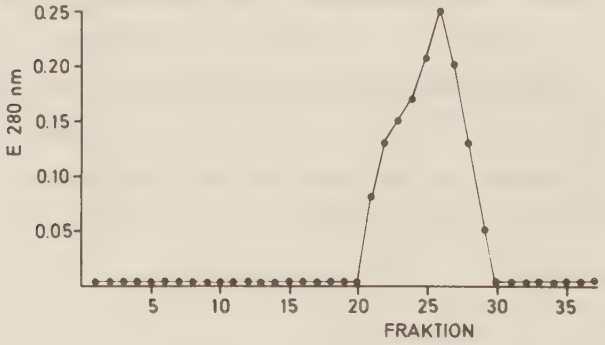

Abb. 1) Gelchromatographie von 4 ml 10 % Dextran 5000-Lösung auf einer Bio Gel A-15 M-Säule (3,0 x 95 cm). Graphische Darstellung der Extinktionen des ersten Peaks bei 280 nm entsprechend dem "void volume".

3.1.2 Gelchromatographie von LSP

Die graphische Darstellung der Extinktionen der Fraktionen bei 280 nm und der Radioaktivität, gemessen im β-Kanal als counts/min, ergab regelmäßig ein charakteristisches Muster. Die Darstellung der Radioaktivitätsverteilung zeigte einen einzigen Peak, der die Fraktionen 20 - 31 umfaßte. Bei der Darstellung der Extinktionen bei 280 nm ergaben sich zwei Peaks. Der erste beinhaltete die Fraktionen 20 - 31, der zweite die von 48 - 82. Somit erfassen der Radioaktivitätsgipfel und der erste Extinktionspeak dieselben Fraktionen im Ausschlußvolumen der Bio Gel A-15 M-Säule, die dann definitionsgemäß als LSP bezeichnet werden. Siehe Abb. 2.

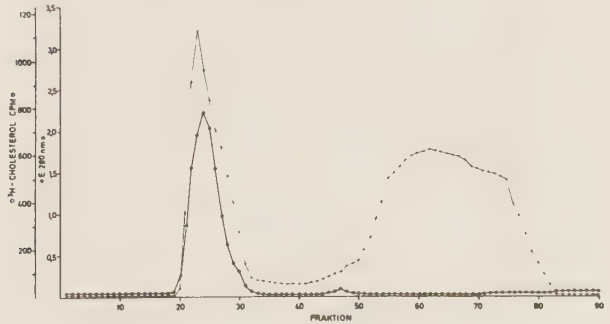

Abb. 2) Gelchromatographie von 4 ml ultrazentrifugiertem Leberhomogenat, mit 1 µCi ^{3}H-Cholesterol markiert, auf einer 3,0 x 95 cm Bio Gel A-15 M-Säule.

3.1.3 Gelchromatographie von KSP

Die graphische Darstellung der Extinktionen der Fraktionen bei 280 nm und der Radioaktivität, gemessen im β-Kanal als counts/min, ergab regelmäßig ein charakteristisches Muster. Die Darstellung der Radioaktivitätsverteilung zeigte einen einzigen Peak, der die Fraktionen 20 - 31 umfaßte. Bei der Darstellung der Extinktionen bei 280 nm ergaben sich zwei Peaks. Der erste beinhaltete die Fraktionen 20 - 31, der zweite die von 48 - 70. Somit erfassen der Radioaktivitätsgipfel und der erste Extinktionspeak dieselben Fraktionen im Ausschlußvolumen der Bio Gel A-15 M-Säule, die dann definitionsgemäß als KSP bezeichnet werden. Siehe Abbildung 3.

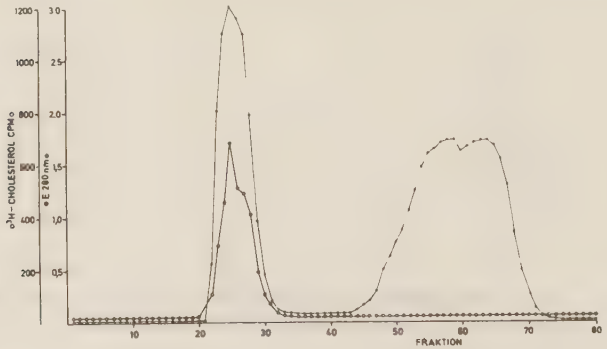

Abb. 3) Gelchromatographie von 4 ml ultrazentrifugiertem Nierenhomogenat, mit 1 µCi ^{3}H-Cholesterol markiert, auf einer 3,0 x 95 cm Bio Gel A-15 M-Säule.

3.2 Protein- und Lipidanalytik

3.2.1 Biochemische Zusammensetzung von LSP

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipide in ihre Einzelkomponenten ermittelte Triglyzeride, freie Fettsäuren, Phospholipide, Cholesterinester und freies Cholesterin als Bestandteile.

Abb. 4) Dünnschichtchromatographie der Lipide des LSP-Komplexes.
Fließmittel: Petrolbenzin/Diäthyläther/Eisessig 90:10:1.
Anfärbung: mit Joddampf.

TriP.	:	Tripalmitat	(Triglyzerid)
PS	:	Palmitinsäure	(freie Fettsäure)
Ch	:	Cholesterin	
CHE	:	Cholesterinester und Cholesterin	
Pl	:	Phosphatidylcholin	(Phospholipid)

Die Bestimmung des Gehaltes an Protein, Triglyzeriden, Cholesterin, freien Fettsäuren und Phospholipiden wurde an 10 durch Säulenchromatographie und anschließender Einengung in einer Ultrafiltrationskammer gewonnener LSP-Komplexe vorgenommen. Die ermittelten prozentualen Anteile sind in ihren Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1) Relative Zusammensetzung in % an Lipiden und Protein der isolierten makromolekularen LSP-Komplexe (n = 10) und ihrer Standardabweichung (s)

	Bereich %	Mittelwert %	s
Protein	42,9 - 65,6	50,4	7,01
Triglyzeride	3,7 - 24,2	11,2	5,9
Gesamtcholesterin	2,8 - 11,1	5,6	2,37
freie Fettsäuren	6,4 - 19,5	12,6	3,59
Phospholipide	12,9 - 28,2	20,2	5,02

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Phospholipide ermittelte Cariolipin, Phosphatidylcholin (= Lecithin), Phosphatidyläthanolamim (= Kephalin), Phosphatidylinositol und Sphingomyelin als Bestandteile. Siehe Abbildung 5.

Abb. 5) Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Phospholipide des LSP-Komplexes.
Anfärbung mit Phosphormolybdänsäure.
Cl: Cardiolipin
PE: Phosphatidyläthanolamin
PC: Phosphatidylcholin
PI: Phosphatidylinositol
SM: Sphingomyelin

Die relative Zusammensetzung der einzelnen Phospholipid-Fraktionen wurde mittels Dünnschichtchromatographie und anschließender Extraktion der einzelnen Komponenten ermittelt. Die aus 10 Bestimmungen zusammengefaßten Verteilungsverhältnisse sind in ihrem Bereich, Mittelwert und ihrer Standardabweichung prozentual in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2) Relative Zusammensetzung in % der Phospholipide des LSP-Komplexes und ihrer Standardabweichung (s); n = 10.

	Bereich %	Mittelwert %	s
Cardiolipin	0,5 - 9,0	5,6	3,74
Phosphatidyl-äthanolamin	7,8 - 50,3	22,9	16,7
Phosphatidyl-cholin	9,3 - 48,4	18,9	16,5
Phosphatidyl-inositol	3,1 - 48,7	17,3	18,4
Sphingomyelin	10,3 - 58,4	35,3	26,6

3.2.2 Biochemische Zusammensetzung von KSP

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Lipide in ihre Einzelkomponenten ermittelte Triglyzeride, freie Fettsäuren, Phospholipide, Cholesterinester und freies Cholesterin als Bestandteile. Siehe Abbildung 6.

Abb. 6) Dünnschichtchromatographie der Lipide des KSP-Komplexes.
Fließmittel: Petrolbenzin/Diäthyläther/Eisessig 90:10:1.
Anfärbung: mit Joddampf.

TriP.:	Tripalmitat	(Triglyzerid)
PS :	Palmitinsäure	(freie Fettsäure)
CH :	Cholesterin	
CHE :	Cholesterinester und Cholesterin	
Pl :	Phosphatidylcholin (Phospholipid)	

Die Bestimmung des Gehaltes an Protein, Triglyzeriden, Cholesterin, freien Fettsäuren und Phospholipiden wurde an 10 durch Säulenchromatographie und anschließender Einengung in einer Ultrafiltrationskammer gewonnener KSP-Komplexe vorgenommen. Die ermittelten prozentualen Anteile sind in ihren Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3) Relative Zusammensetzung in % an Lipiden und Protein der isolierten makromolekularen KSP-Komplexe (n = 10) und ihrer Standardabweichungen (s).

	Bereich %	Mittelwert %	s
Protein	47,6 - 73,6	60,4	10,05
Triglyzeride	2,4 - 22,0	11,0	7,54
Gesamtcholesterin	1,0 - 6,8	4,7	2,31
freie Fettsäuren	1,4 - 7,8	4,4	1,76
Phospholipide	11,2 - 31,2	19,5	6,97

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Phospholipide ermittelte Phosphatidylcholin (= Lecithin), Phosphatidyläthanolamin (= Kephalin), Phosphatidylinositol, Cardiolipin und Sphingomyelin als Bestandteile des KSP-Komplexes.

Siehe Abbildung 7.

Abb. 7) Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Phospholipide des KSP-Komplexes.
Anfärbung mit Phosphormolybdänsäure.
Cl: Cardiolipin
PE: Phosphatidyläthanolamin
PC: Phosphatidylcholin
PI: Phosphatidylinositol
SM: Sphingomyelin

Die relative Zusammensetzung der einzelnen Phospholipidfraktionen wurde durch Dünnschichtchromatographie und anschließender Extraktion ermittelt. Die aus 10 Bestimmungen ermittelten Zusammensetzungen in ihren prozentualen Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

Tabelle 4) Relative Zusammensetzung in % der Phospholipide des KSP-Komplexes und ihrer Standardabweichungen (n = 10).

	Bereich %	Mittelwert %	s
Cardiolipin	5,6 - 24,3	9,4	7,5
Phosphatidyl-äthanolamin	20,0 - 29,9	24,9	3,25
Phosphatidyl-cholin	16,4 - 48,9	30,9	11,6
Phosphatidyl-inositol	7,7 - 33,3	19,2	10,4
Sphingomyelin	10,1 - 21,5	15,6	5,38

3.3 Kohlenhydrataffinitätschromatographie

3.3.1 LSP

Bei der Affinitätschromatographie für Kohlenhydrate über eine Con A-Säule zeigte der radioaktiv markierte LSP-Gesamtkomplex in den 8 Fraktionen des an Con A nicht gebundenen Mateirals bei der graphischen Darstellung einen einzigen Peak, der die Fraktionen 1 und 2 umfaßte. In den 8 Fraktionen der Elution eventuell gebundenen Materials konnte bei der graphischen Darstellung kein weiterer Aktivitätsgipfel mehr gefunden werden. Siehe Abbildung 8.

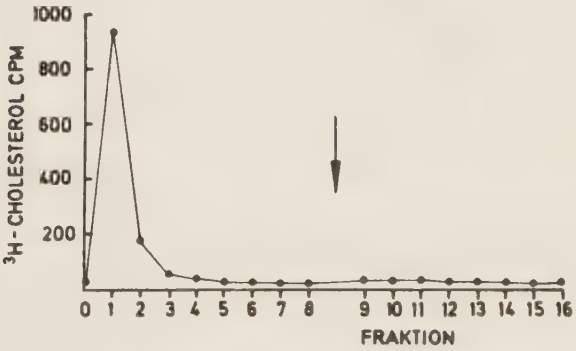

Abb. 8) Affinitätschromatographie des mit ^{3}H-Cholesterol markierten LSP-Gesamtkomplexes über eine 0,55 x 5,5 cm Con A-Säule.

↓ Zugabe von Glucopyranosid zur Elution eventuell gebundener Kohlenhydrate.

Bei der Affinitätschromatographie auf Kohlenhydrate des mit SDS und Mercaptoäthanol gespaltenen LSP-Komplexes über eine Con A-Säule erbrachte die graphische Darstellung der Extinktionen der 8 Fraktionen im Lowry-Test des an Con A nicht gebundenen Materials einen Peak, der die Fraktionen 1 und 2 umfaßte. In den 9 Fraktionen der Elution eventuell gebundenen Materials konnte bei der graphischen Darstellung kein weiterer Peak mehr gefunden werden. Siehe Abbildung 9.

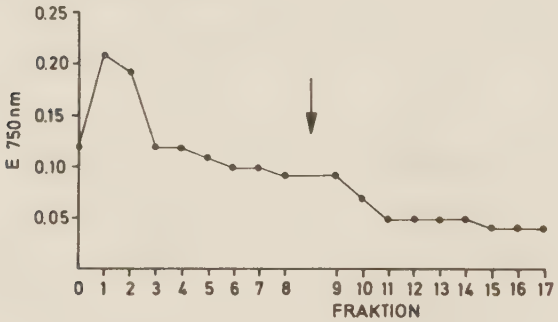

Abb. 9) Affinitätschromatographie des mit SDS und Mercaptoäthanol gespaltenen LSP-Komplexes über eine 0,55 x 5,5 cm Con A-Säule. Graphische Darstellung der Extinktionen im Lowry-Test bei 750 nm.

↓ Zugabe von Glucopyranosid zur Elution eventuell gebundener Kohlenhydrate.

3.3.2 Kohlenhydrataffinitätschromatographie von KSP

Bei der Affinitätschromatographie für Kohlenhydrate über eine Con A-Säule zeigte der radioaktiv markierte KSP-Gesamtkomplex in den 8 Fraktionen des an Con A nicht gebundenen Materials bei der graphischen Darstellung einen einzigen Peak, der die Fraktionen 1 und 2 umfaßte. In den 8 Fraktionen der Elution eventuell gebundenen Materials konnte kein weiterer Aktivitätsgipfel bei der graphischen Auswertung mehr gefunden werden. Siehe Abbildung 10.

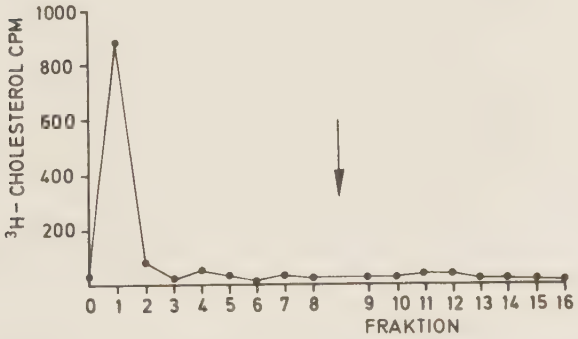

Abb. 10) Affinitätschromatographie des mit ^{3}H-Cholesterol markierten KSP-Gesamtkomplexes über eine 0,55 x 5,5 cm Con A-Säule.

↓ Zugabe von Glucopyranosid zur Elution eventuell gebundener Kohlenhydrate.

Bei der Affinitätschromatographie für Kohlenhydrate des mit SDS und Mercaptoäthanol gespaltenen KSP-Komplexes über eine Con A-Säule erbrachte die graphische Auswertung der Extinktionen der 8 Fraktionen im Lowry-Test bei 750 nm des an Con A nicht gebundenen Materials einen Peak, der die Fraktionen 1 und 2 umfaßte. In den 9 Fraktionen der Elution eventuell gebundenen Materials konnte bei der graphischen Auswertung kein weiterer Extinktionsgipfel mehr gefunden werden. Siehe Abbildung 11.

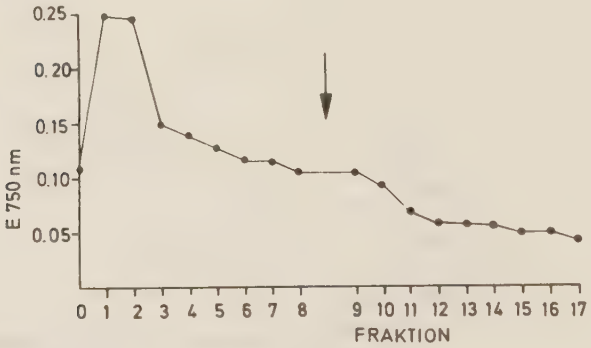

Abb. 11) Affinitätschromatographie des mit SDS und Mercaptoäthanol gespaltenen KSP-Komplexes über eine 0,55 x 5,5 cm Con A-Säule.

↓ Zugabe von Glucopyranosid zur Elution eventuell gebundener Kohlenhydrate.

Graphische Darstellung der Extinktionen bei 750 nm im Lowry-Test.

3.4 Gradientenultrazentrifugation

3.4.1 LSP

Die graphische Darstellung der 11 Fraktionen der isopyknischen Ultrazentrifugation im CsCl-Dichtegradienten wurde entsprechend ihrer Dichte in g/cm^3, ihrer Extinktion bei 280 nm und ihrer Radioaktivität an ^{3}H-Cholesterol als counts/min vorgenommen. Gemessen an der Radioaktivität ließ sich ein Peak bei Fraktion 7 erkennen, entsprechend der Dichte 1,16. Die Extinktionsdarstellung bei 280 nm erbrachte 2 Peaks. Der erste, bei Fraktion 7, entsprach also dem Radioaktivitätsgipfel. Währenddessen befand sich der zweite Peak am Boden des Zentrifugenröhrchens. Ihm ist eine Dichte von 1,43 zuzuordnen. Dieser zweite Extinktionspeak trat nur bei 5 von 9 untersuchten Läufen auf. Siehe Abbildung 12.

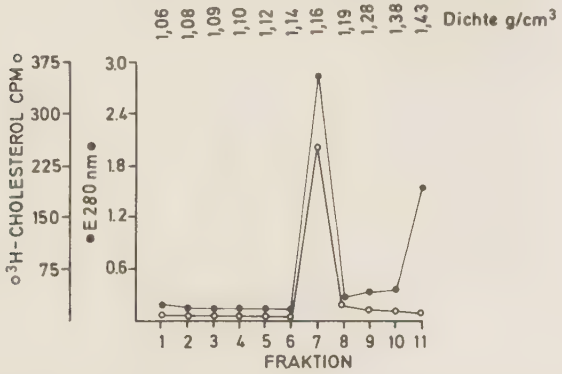

Abb. 12) Isopyknische Ultrazentrifugation des LSP-Komplexes im CsCl-Dichtegradienten.

3.4.2 Gradientenultrazentrifugation von KSP

Die graphische Darstellung der 11 Fraktionen der isopyknischen Ultrazentrifugation im CsCl-Dichtegradienten wurde entsprechend ihrer Dichte in g/cm^3, ihrer Extinktion bei 280 nm und ihrer Radioaktivität an ^{3}H-Cholesterol in counts/min vorgenommen. Gemessen an der Radioaktivität ließ sich genau ein Peak bei Fraktion 7, entsprechend der Dichte 1,17, erkennen. Die Extinktionsdarstellung bei 280 nm erbrachte 2 Peaks. Der erste, dem die Fraktion 7 und die Dichte 1,17 zuzuordnen ist, entspricht also dem Radioaktivitätsgipfel. Der zweite Peak befand sich am Boden des Zentrifugenröhrchens und umfaßte die Fraktion 11 bzw. die Dichte 1,41. Dieser Extinktionspeak trat nur bei 6 von 10 untersuchten Läufen auf. Siehe Abbildung 13.

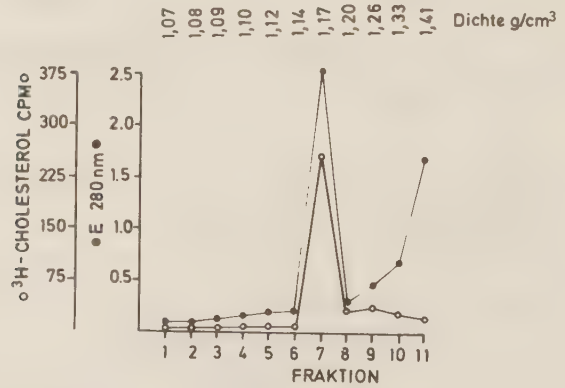

Abb. 13) Isopyknische Ultrazentrifugation des KSP-Komplexes im CsCl-Dichtegradienten.

3.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

3.5.1 LSP

Der in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgespaltene Proteinanteil des LSP-Komplexes zeigte in der Silberfärbung mindestens 12 Banden in einem Molekulargewichtsbereich von 15 000 bis ca. 130 000 Dalton. Siehe Abbildung 14.

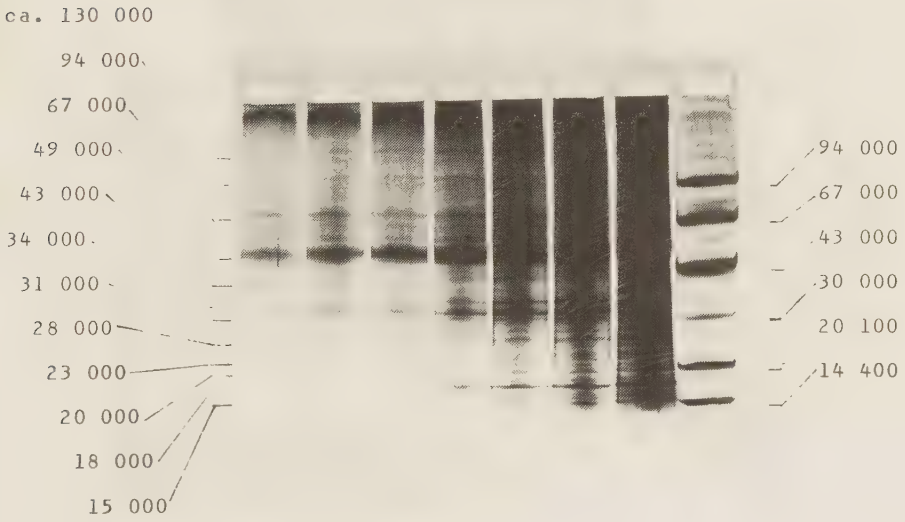

Abb. 14) Verdünnungsreihe von LSP in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophores im horizontalen Ultradünnschichtverfahren mit Porengradientengelen. Silberfärbung. Kalibrierungskit von Pharmacia.

3.5.2 KSP-SDS-PAGE

Der in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgespaltene Proteinanteil des KSP-Komplexes zeigte in der Silberfärbung mindestens 12 Banden in einem Molekulargewichtsbereich von 15 000 bis ca. 130 000 Dalton. Siehe Abbildung 15.

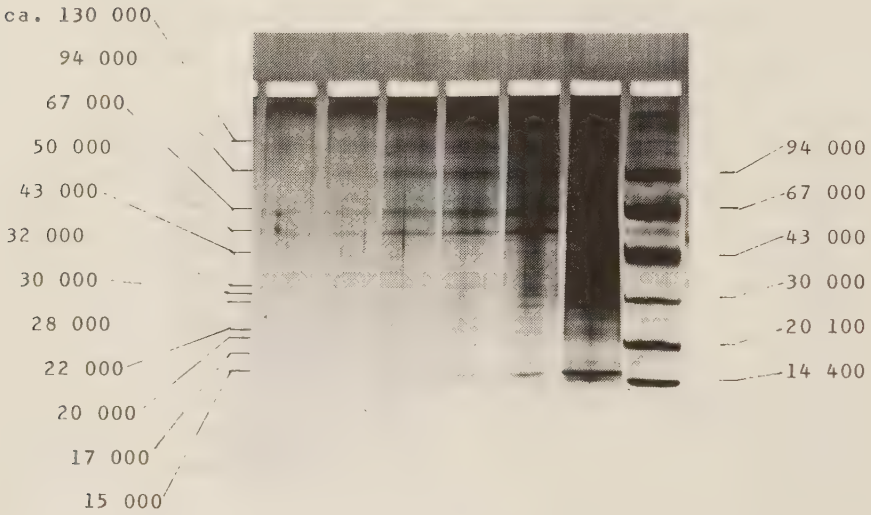

Abb. 15) Verdünnungsreihe von KSP in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese im horizontalen Ultradünnschichtverfahren mit Porengradientengelen. Silberfärbung. Kalibrierungskit von Pharmacia.

3.6 Elektronenmikroskopie

3.6.1 LSP

Bei der im negative-staining Verfahren durchgeführten Elektronenmikroskopie ergab sich ein regelmäßiges Muster von Partikeln im Durchmesser von 30 - 100 nm. Siehe Abbildung 16.

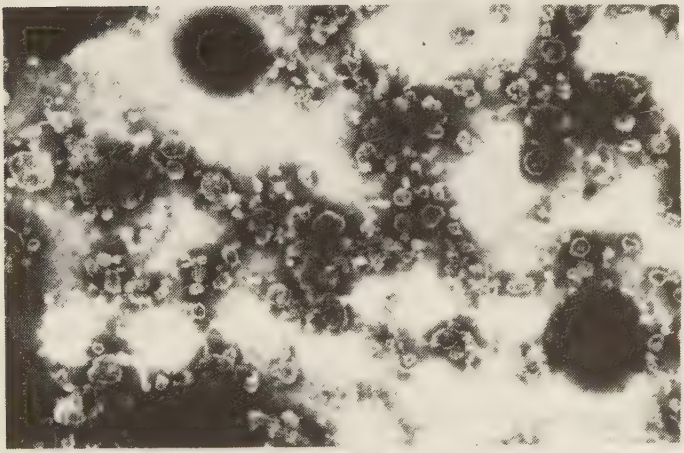

Abb. 16) Elektronenmikroskopische Aufnahme des LSP-Komplexes im negative-staining Verfahren. Färbung mit 2 % Phosphorwolframsäure. Vergrößerung 40 000.

3.6.2 Elektronenmikroskopie von KSP

Bei der im negative-staining Verfahren durchgeführten Elektronenmikroskopie ergab sich ein regelmäßiges Muster von Partikeln im Durchmesser von 30 - 60 nm. Siehe Abbildung 17.

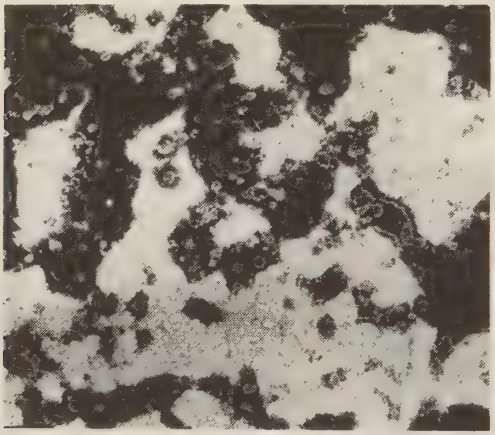

Abb. 17) Elektronenmikroskopische Aufnahme des KSP-Komplexes im negative-staining Verfahren. Färbung mit 2 % Phosphorwolframsäure. Vergrößerung 40 000.

4. Diskussion und Vergleich

4.1 Methodik

Dank der durch Mc Farlane [16] eingeführten Methode (Ultrazentrifugation und Gelchromatographie) bereitete es keine Schwierigkeiten die entsprechenden LSP- und KSP-Komplexe zu gewinnen. Es erwies sich als vorteilhaft, den Ultrazentrifugationsüberstand nur über eine Gelfiltrationssäule laufen zu lassen, wie es auch schon Mc Farlane als Alternative vorgeschlagen hatte. Dadurch ließ sich der Zeitfaktor zur Gewinnung der hochmolekularen Komplexe auf ca. die Hälfte der sonst üblichen Zeit reduzieren, bei gleichbleibender Qualität [16].

Die Markierung des hochmolekularen Komplexes aufgrund seines Lipidanteils mit radioaktivmarkiertem ^{3}H-Cholesterol war eine entscheidende Verbesserung. Damit ließ sich der Lipoproteinkomplex mittels Radioaktivitätsmessung im β-Kanal eines Szintillationszählers relativ einfach und schnell wiederfinden. Aufgrund seiner verhältnismäßig langen Halbwertszeit und seiner unproblematischen Handhabung im Labor wurde die radioaktive Tritium-Markierung gegenüber anderen Nukleiden vorgezogen.

Die radioaktive Markierung des Lipoproteinkomplexes erwies sich als relativ beständig. So band sich praktisch das ganze ^{3}H-Cholesterol während der Inkubation an den Lipoproteinkomplex und spaltete sich bei den weiteren Untersuchungsgängen nicht mehr in größerem Umfange ab. Dadurch fand sich immer nur ein Radioaktivitätsgipfel, der immer einen begleitenden Peak bei der Messung der Extinktion bei 280 nm (wobei hauptsächlich Proteine gemessen werden) hatte.

Die Bestimmung des Proteinanteils nach Lowry und der Phospholipide nach Subbarow entsprechend den Literaturangaben ließen sich ohne Schwierigkeiten durchführen. Zur Bestimmung des Gesamtcholesterins (wegen der niedrigen Konzentration an Gesamtcholesterin konnten die Anteile an freien und veresterten Cholesterin nicht getrennt bestimmt werden), der Triglyzeride, freien, unveresterten Fettsäuren wurden handelsübliche Kits verwendet, wobei die Konzentrationsangaben der verwendeten Chemikalien entsprechend den niedrigeren Konzentrationen der zu bestimmenden Substanzen geändert wurde.

Bei allen qualitativen Bestimmungen (Proteine, Triglyzeride, Gesamtcholesterin, freie Fettsäuren und

Phospholipide) wurden Kontrollseren (Precilip der Fa. Boehringer, Mannheim) mitgeführt. Die Werte für die Kontrollseren lagen immer im Vertrauensbereich.

Die Con A-Kohlenhydrataffinitätschromatographie wurde einmal mit dem Gesamtkomplex und einmal mit dem SDS gespaltenen Material durchgeführt. Zwar beträgt das Ausschlußmolekulargewicht des Con A-Sepharose Gels 20 Millionen Dalton; trotzdem wurden schon größere kohlenhydrathaltige Membran- und Lipoproteinpartikel gebunden [43]. Sicherheitshalber wurde deshalb aber der gesamte Komplex vorsichtig mit 1 % SDS aufgespalten und dann erst chromatographiert.

Die isopyknische Ultrazentrifugation im CsCl-Dichtegradienten bereitete keinerlei Problem. Der Radioaktivitätspeak und der Extinktionsgipfel bei Fraktion 7 war so umschrieben, daß er makroskopisch sichtbar war und ein Scheibchen von ca. 1 mm Dicke bildete.

Entsprechend der hochsensiblen Anfärbung der SDS-PAG-Elektrophorese im Silberverfahren sind die meisten Banden doppel- und dreifachkonturiert. Dies kommt durch die nicht immer an der gleichen Stelle im Proteingerüst spaltenden Substanzen SDS und Mercaptoäthanol zustande. Auch muß ein gewisser Teil an

selbständiger Proteolyse in Betracht gezogen werden.

Da sich Lipide und damit auch Lipoproteinkomplexe nur äußerst schlecht, wenn überhaupt, mit den zur Elektronenmikroskopie üblichen Einbettungsverfahren, die durch ihre lipidlöslichen Eigenschaften bekannt sind, darstellen lassen, wurde zur elektronenmikroskopischen Sichtbarmachung des LSP- und KSP-Komplexes das negative-staining-Verfahren gewählt.
Anhand der Durchmesser der Partikel in den EM-Aufnahmen läßt sich das Volumen (unter 1. Annäherung kugelförmig) und unter Zugrundelegung der in der Ultrazentrifugation gewonnenen Dichte das Molekulargewicht des Komplexes bestimmen. Dazu wird angenommen, daß ein Partikel im EM-Bild einem LSP- bzw. KSP-Komplex entspricht.

4.2 LSP

Seitdem sich die Forschung mit LSP beschäftigt, wurde es als Lipoprotein klassifiziert. Das hier ermittelte Gesamtlipid/Proteinverhältnis von 0,98 fügt sich nahtlos in das von Lebwohl [34] im Bereich von 0,24 - 1,09 beschriebene. Die einzige weitere gemeinsame Aussage der LSP-Forschung ist die des "Phospholipidreichtums".

Auch diese Aussage kann bestätigt werden mit einem Phospholipidanteil von 20,2 %, bei einem Proteingehalt von 50,4 %. Mc Farlane [16] ermittelte ein ähnliches Phospholipid/Proteinverhältnis von 0,48.
Die in dieser Studie ermittelten Phospholipidkomponenten Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylinositol, Cardiolipin und Sphingomyelin ähneln dem von Hütteroth [17] beschriebenen Verteilungsmuster.
Der auch schon von Mc Farlane [29] beschriebene Triglyzeridanteil (ohne explizite Prozentangaben) konnte hier auf 11,2 % beziffert werden, während der gefundene Cholesterinanteil von 5,5 % ungefähr 14 mal so hoch wie der von Hütteroht [17] angegebene Wert war. Hütteroth erwähnte nämlich einen Cholesterinwert von 0,4 % und wies einen Proteinanteil von 85 %, einen Phospholipidanteil von 1,2 % und Triglyzeride mit 13 % aus. Damit stimmt der Wert der Triglyzeride in etwa mit dem hier gefundenen von 11,2 % überein. Bemerkenswert ist nur, daß er von großen Phospholipidmengen sprach und ihnen dann nur einen Anteil von 1,2 % zuweisen konnte!
Die freien Fettsäuren, die in dieser Studie im LSP-Komplex mit 12,6 % vertreten waren, sind bisher noch nirgends als LSP-Bestandteil beschrieben worden.
Das gefundene Protein/Lipidverhältnis mit seinem

charakteristischen Phospholipidmuster und -anteil ist vereinbar mit der schon von Meyer z. B. [13] gemachten Aussage, daß LSP als Membranbestandteil zu betrachten sei. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und auch die von Lebwohl [34] beschriebenen zeigen ein gleichmäßiges Muster von Partikeln im Durchmesser von 30 - 100 nm, die man als Lipidkomplexe und Membranpartikel beschreiben könnte.

Da in der Kohlenhydrataffinitätschromatographie über eine Con A-Säule keine Anteile von LSP gebunden wurden, kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei LSP nicht um ein Glyko-Lipoprotein handelt. Damit läßt sich eine Aussage über die Lokalisation von LSP innerhalb der Zellmembran machen. Da die Proteinkomponenten der äußeren Hälfte der Lipiddoppelschicht, die die Zellmembran charakterisiert, bei den Säugetieren [47,48] glykogenhaltig ist, kann es sich bei LSP nicht um einen Lipoproteinkomplex handeln, der ganz außen in der Zellmembran lokalisiert ist.
Das Phospholipidverteilungsmuster steht nun zu dieser These größtenteils im Widerspruch. Zwar wurde berichtet [47,48], daß Phosphoäthanolamin, das 22,9 % von LSP ausmacht, größtenteils an der inneren Seite der Zellmembran zu finden sei. Aber die cholinhaltigen Phospho-

lipide (Phosphatidylcholin mit 18,9 % und Sphingomyelin mit 35,3 %) sind in diesem Ausmaß an der äußeren Hälfte der Zellmembran lokalisiert.
Man kann nun die These aufstellen, daß LSP entweder transmembranär oder an der Innenseite der äußeren Hälfte der Zellmembran lokalisiert ist, aber keinen Kontakt zur äußersten Zelloberfläche besitzt, da es nicht glykogenhaltig ist. Diese These würde auch den klinischen Befund stützen. Denn bei zellulären Schäden des Leberparenchyms, wobei die Zellmembranen als erstes beschädigt werden, sei es z. B. durch Viren, kann LSP erst als Antigen wirken und immunpathogenetisch Folgeerkrankungen unterhalten.

Die Proteinanalytik ergab in der SDS-PAG-Elektrophorese ein charakteristisches und reproduzierbares Muster mit 12 Banden im Molekulargewichtsbereich von 15 000 bis 130 000 Dalton. Da mehrere Autoren [17,34] Bandenmuster ohne jegliche Bezugsgröße veröffentlichten, ist der gegenseitige Vergleich kaum möglich. Das von Behrens [15] beschriebene Bandenmuster ähnelt dem hier gefundenen im MGW-Bereich von 40 000 - 96 000. Die Banden von 15 000 - 40 000 und die von 130 000 sind aber dort nicht beschrieben.
Lebwohl [34] fand in der SDS-PAGE von apo-LSP eine

starke Bande im Bereich von 45 - 50 000, die in seiner SDS-PAGE des Gesamt-LSP-Komplexes nicht so stark hervorgetreten war. In diesem Molekulargewichtsbereich konnte auch hier eine farbintensive Bande bei 49 000 gefunden werden.

Mc Farlane [16] beschrieb eine Bande bei 69 000, die dieselbe Beweglichkeit wie Albumin aufwies. Trotz sorgfältigster Präparation des LSP-Komplexes konnte er diese Bande nicht ändern. Aber eine komplette Elimination dieser Bande erreichte er in einer SDS-PAGE einer apo-LSP-Präparation. Auch hier fand sich eine Bande bei 67 000. Ob diese nun wirklich Albumin repräsentiert, muß solange in Frage gestellt werden, bis Albumin immunelektrophoretisch in einem zweidimensionalen Verfahren nachgewiesen wird. Denn Behrens [28] konnte im Ouchterlony-Test immunologisch kein Albumin nachweisen, obwohl sie auch eine Bande bei 69 000 in der SDS-PAGE darstellen konnte.

Die bestimmte Dichte des LSP-Komplexes im CsCl-Dichtegradienten mit 1,16 g/cm^3 entspricht dem Protein/Lipidverhältnis und stimmt mit dem von Behrens [28] ermittelten Wert von 1,15 sehr gut überein. Aber in ca. der Hälfte der Ultrazentrifugenläufe fand sich ein zweiter Peak am Boden des Röhrchens bei einer Dichte von 1,43, der keine Radioaktivität mehr aufwies und nur durch seine Extinktion bei 280 nm charakterisiert

ist. Deshalb dürfte es bei diesem Peak um Eiweißbestandteile sich handeln, die so fest im LSP-Komplex gebunden sind, daß sie in der Gelfiltration nicht abgespalten werden, aber den starken Flotationskräften in der Ultrazentrifuge nicht gewachsen sind. Diese Zweigipfligkeit wurde auch schon von Manns [31] bestätigt, der den einen bei 1,11 g/cm^3 und den anderen bei 1,34 fand. Mittels Radioimmunopräzipitationsassay konnte er den Peak bei 1,11 als den antigenmäßig relevanten beschreiben.

Die aus dem Durchmesser (in der Elektronenmikroskopie bestimmt) und der Dichte zu ermittelnde LSP-Größe beträgt ca. 100 Millionen Dalton. Dies stimmt auch mit den bisherig aus Gelfiltrationen gewonnenen Informationen gut überein, die von einem Molekulargewicht von über 20 Millionen ausgingen. Deshalb erschien der LSP-Komplex im Ausschlußvolumen der Bio Gel A-15 M-Säule.

4.3 KSP

KSP wurde bisher meistens nur als makromolekulares Lipoprotein beschrieben und auf seine Kreuzantigenität mit LSP untersucht. Genaue Daten zur Protein-

und Lipidanalytik sind noch nicht veröffentlicht worden.

Das Gesamtlipid/Proteinverhältnis beträgt 0,65, bei einem relativen Phospholipidreichtum von 19,5 % des KSP-Komplexes. Die Triglyzeride betragen 11,0 %. Mit 4,7 % an Gesamtcholesterin und 4,4 % freien Fettsäuren sind diese Lipide im KSP-Komplex nur wenig vertreten. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit den vagen Aussagen bisheriger Literaturstellen, daß die biochemische Zusammensetzung der von LSP größtenteils ähnelt.

Das Phospholipidmuster mit 9,4 % Cardiolipin, 24,9 % Phosphatidyläthanolamin, 30,9 % Phosphatidylcholin, 19,2 % Phosphatidylinositol und 15,6 % Sphingomyelin in Zusammenschau mit der übrigen Protein- und Lipidverteilung ähnelt dem eines membranären Bestandteiles. Auch die Elektronenmikroskopie zeigte Strukturen, die als Membranpartikel bzw. Lipidkomplexe zu deuten sind.

Da in der Kohlenhydrataffinitätschromatographie über eine Con A-Säule keine Anteile von KSP gebunden wurden, muß es sich bei KSP um einen Lipoproteinkomplex handeln, der keinen Glykogenanteil besitzt. Damit kann KSP nicht in der äußeren Hälfte der Zellmembran lokalisiert sein, da dort die Lipoproteine glykogenhaltig sind [47,48].

Das Phospholipidverteilungsmuster steht mit dieser These nicht im Einklang. Zwar wird berichtet [47,48], daß Phosphoäthanolamin (das 24,9 % der KSP-Phospholipide ausmacht) größtenteils an der inneren Seite der Lipiddoppelschicht der Zellmembran zu finden sei. Aber die cholinhaltigen Phospholipide (die in KSP mit 30,9 % Phosphatidylcholin und 15,6 % Sphingomelyin vertreten sind) charakterisieren in diesem Ausmaß die äußere Hälfte der Zellmembran.
In Zusammenschau dieser Fakten kann man die These aufstellen, daß KSP entweder ein transmembranäres Lipoprotein ist, oder in der inneren Seite der äußeren Hälfte der Lipiddoppelschicht der Zellmembran gelegen sei, ohne Zugang zur Zelloberfläche zu besitzen.

Die Proteinanalytik ergab in der SDS-PAG-Elektrophorese ein charakteristisches und reproduzierbares Muster mit 12 Banden im Molekulargewichtsbereich von 15 000 - 130 000 Dalton. Da mehrere Autoren [17,34] Bandenmuster ohne jegliche Bezugsgröße veröffentlichten, ist der gegenseitige Vergleich erschwert. Das von Behrens [28] mit Molekulargewichtsangaben beschriebene Bandenmuster ähnelt dem hier gefundenen im Bereich von 40 000 - 96 000. Die Banden von 15 000 - 40 000 und die von 130 000 sind dort aber nicht erwähnt. Lebwohl [34] erklärte ausdrücklich, daß die starke Bande im Bereich

von 45 - 50 000, wie sie in seiner LSP-SDS-PAGE aufgetreten war, bei KSP nicht sichtbar gewesen sei. In dieser Studie konnte man deutlich eine Bande im Bereich von 50 000 Dalton sehen.
Im Molekulargewichtsbereich von 67 000, die dem von Albumin entspricht, ist eine starke Bande sichtbar, die auch von Mc Farlane [16] und Behrens [28] beschrieben wurde. Trotzdem konnte Behrens Albumin im Ouchterlony-Test mit Anti-KSP-Seren keine Reaktion gegenüber Albumin nachweisen. Deshalb muß bis zur weiteren Abklärung etwa in einem zweidimensionalen Verfahren in Frage gestellt werden, ob es sich bei dieser Bande nicht um ein Protein ähnlichen Molekulargewichtes handelt.

Die bestimmte Dichte des KSP-Komplexes im CsCl-Dichtegradienten mit 1,17 g/cm^3 entspricht dem Protein/Lipidverhältnis und stimmt mit dem von Behrens [28] ermittelten Wert von 1,15 gut überein. Aber in ca. der Hälfte der Ultrazentrifugationen fand sich ein zweiter Peak am Boden des UZ-Röhrchens bei einer Dichte von 1,41, der keine Radioaktivität mehr aufwies und nur durch seine Extinktion bei 280 nm charakterisiert ist. Deshalb dürfte es sich bei diesem Peak um Eiweißbestandteile handeln, die so fest im KSP-Komplex ge-

bunden sind, daß sie in der Gelfiltration nicht abgespalten werden, aber den starken Flotationskräften in der Ultrazentrifuge nicht gewachsen sind. Diese Zweigipfligkeit wurde auch schon von Manns [31] bestätigt, der den einen Gipfel bei 1,14 und den anderen bei 1,36 fand. Mittels Radioimmunopräzipitationsassay konnte er den Peak bei 1,14 als den antigenmäßig relevanten beschreiben.

Das aus dem elektronenmikroskopischen Bild, bei dem sich ein regelmäßiges Muster von Partikeln im Durchmesser von 30 - 60 nm fand, und der Dichte zu ermittelnde Größe des KSP-Komplexes beträgt ca. 50 Millionen Dalton. Dies stimmt mit den bisherig aus Gelfiltrationen gewonnenen Informationen gut überein, die von einem Molekulargewicht von über 20 Millionen ausgingen. Deshalb erscheint der KSP-Komplex im Ausschlußvolumen einer Bio Gel A-15 M-Säule, wie sie auch verwendet wurde.

Die biochemischen Daten von KSP ähneln in vieler Hinsicht dem von Jüngst [49] aus Urin gewonnenen Lipoproteinkomplex. Auch dieser ist hochmolekular und wies in der Elektronenmikroskopie im negative-staining-Verfahren einen Durchmesser von 10 - 70 nm auf. Die SDS-PAG-Elektrophorese zeigte bis zu 10 Banden im Molekulargewichtsbereich von 35 000 bis über 90 000 auf,

wobei eine Bande dieselbe elektrophoretische Mobilität wie Albumin aufwies. Damit ähnelte es dem Bandenmuster von KSP.

Die Protein/Lipidanalytik dieses Urinlipoproteins, das einen Proteinanteil von 53,5 % bei einem Anteil von 11,4 % Triglyzeride, 3,3 % Cholesterin und 20,9 % Phospholipide umfaßte, zeigte ebenfalls in überraschenderweise Ähnlichkeit mit KSP. Entsprechend dieser Protein/Lipidzusammensetzung lag seine Dichte in einem Bereich von 1,1 - 1,3 g/ml.

Die Phospholipidzusammensetzung mit 30,3 % Phosphatidyläthanolamin, 27,6 % Phosphatidylcholin, 20,4 % Phosphatidylserin und 19,8 % Sphingomyelin wies nur geringe Unterschiede zu KSP auf.

Die immunologische Verwandtschaft dieses Urinlipoproteinkomplexes mit LSP und KSP konnte Jüngst im Ouchterlonyimmundiffusionstest mittels Anti-LSP- und Anti-KSP-Seren nachweisen.

Dieses Urinlipoprotein fand sich im Urin gesunder Erwachsener in geringen Mengen, während es bei verschiedenen benignen und malignen Erkrankungen der Niere und ableitenden Harnwege in erhöhten Konzentrationen vorkam.

Es kann vermutet werden, daß es sich bei dem von Jüngst beschriebenen Urinlipoproteinkomplex und KSP

um sehr verwandte, wenn nicht sogar identische Substanzen handelt, die dann bei entsprechenden Erkrankungen und natürlich auch schon bei Gesunden in geringerem Maße aufgrund des natürlichen Zellumsatzes im Urin erscheinen.
Zum Beweis dieser eventuellen Identität dieser beiden Substanzen müßten aber noch weitere Untersuchungen vorgenommen werden.

5. Zusammenfassung

Die Kreuzantigenität von LSP und KSP ist in der Literatur schon seit langem bekannt. Auch die enge biochemische Verwandtschaft der beiden Substanzen ist schon öfters erwähnt worden. Diese Studie zeigt aber detailliert und quantitativ die beiden Lipoproteinkomplexe vergleichend in ihrem biochemischen Grundgerüst, das durch ihre Protein- und Lipidanteile gekennzeichnet ist.
Bei beiden ist aufgrund ihrer oben erwähnten biochemischen Zusammensetzung anzunehmen, daß sie als Membranbestandteile zu betrachten sind, die aber nicht frei an der Zellmembranoberfläche liegen.

Die Makromolekularität der beiden Substanzen konnte

aufgrund der EM-Aufnahmen und der Dichtezentrifugation ebenfalls quantifiziert werden.
Die geringfügig veränderten biochemischen Daten und die etwas verschobenen Banden in der SDS-PAGE dürften Ausdruck der verschiedenen Organzugehörigkeit der beiden Substanzen sein sowie auf die biologische Varianz des verwendeten Materials und der Methodik zurückzuführen sein.
Die enge biochemische Verwandtschaft von LSP und KSP ist in der Tabelle 5 zusammenfassend quantitativ wiedergegeben.
Bemerkenswert ist auch die enge biochemische Verwandtschaft von LSP und KSP mit dem von Jüngst dargestellten Urinlipoproteinkomplex.

Tabelle 5) Zusammenfassende quantitative Gegenüberstellung von LSP und KSP

	LSP	KSP
Protein/Lipidanalytik		
Protein	50,4 %	60,4 %
Triglyzeride	11,2 %	11,0 %
Cholesterin	5,6 %	4,7 %
freie Fettsäuren	12,6 %	4,4 %
Pholspholipide	20,2 %	19,5 %
Phospholipidmuster		
Phosphatidyläthanolamin	22,9 %	24,9 %
Phosphatidylcholin	18,9 %	30,9 %
Phosphatidylinositol	17,3 %	19,2 %
Cardiolipin	5,6 %	9,4 %
Sphingomyelin	35,3 %	15,6 %
Dichte	1,16 g/cm^3	1,17 g/cm^3
Durchmesser in der EM	30 - 100 nm	30 - 60 nm
Lipoproteinkomplexgröße	100 Mio Dalton	50 Mio Dalton
Glykogenhaltigkeit	Ø	Ø
SDS-PAGE mit im MGW-Bereich	12 Banden 15 - 130 000 Dalton	12 Banden 15 - 130 000 Dalton

6. Literaturübersicht

1. Claude, A.:
Fraction from normal chick embryo similar to tumor producing fraction of chicken tumor.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.), 1938, 39, 398 - 403.

2. Perlmann, P., D'Amielo, V.:
Soluble antigens in microsomes and other cell fractions of rat liver.
Nature (London), 1958, 181, 491.

3. D'Amielo, V., Perlmann, P.:
The distribution of soluble antigens in cellular structures of rat liver.
Exp. Cell. Res., 1960, 19, 383 - 398.

4. Vogt, P. K.:
The localization of tissue-specific antigens within the structural components of endoplasmatic retickulum.
Z. Naturforsch., 1960, 15 B, 221 - 225.

5. Dumonde, D. C.:
Tissue-specific antigens.
Advances of Immunology, 1966, 5, 245 - 412.

6. Dörner, M., Simon, E. J., Miescher, P. A.:
Studies on a liver specific antigen.
Fed. Proc., 1962, 21, 43.

7. Meyer zum Büschenfelde, K. H., Schrank, Ch.:
Untersuchungen zur Frage organspezifischer
Antigene der Leber.
Klin. Wochenschrift, 1966, 44, 654 - 656.

8. Meyer zum Büschenfelde:
Untersuchungen über die immunologische Bedeutung
löslicher Leberproteine.
Zeitschr. ges. exp. Med., 1968, 148, 131 - 163 und
Verh. Dtsch. Ges. inn. Med., 1968, 529, 533.

9. Schuhmacher, K., Koch, W.:
Untersuchungen zur Spezifizität antizytoplasmatischer Antikörper bei chron. progr. Hepatitis.
Klin. Wschr., 1968, 46, 925.

10. Meyer zum Büschenfelde:
Klinische Untersuchungen zur immunologischen
Spezifizität des Leberparenchyms.
Arch. f. klin. Med., 1968, 215, 107 - 132.

11. Kössling, F. K., Meyer zum Büschenfelde, K. H.:
Zur Induktion einer aktiven chronischen Hepatitis durch heterologe Leberproteine.
Virchow's Arch. path. Anat., 1968, 345, 365 - 376.

12. Kössling, F. K., Meyer zum Büschenfelde, K. H.:
Zur Pathogenese der aktiven chronischen Hepatitis.
Ztschr. ges. exp. Med., 1970, 153, 150 - 161.

13. Meyer zum Büschenfelde, K. H., Miescher, P. A.:
Liver specific antigens. Purification and charakterization.
Clin. exp. Imm., 1972, 10, 89 - 102.

14. Meyer zum Büschenfelde, K. H., Kössling, F. K., Miescher, P. A.:
Experimental chronic active hepatitis in rabbits following immunization with human liver protein.
Clin. exp. Immunol., 1972, 10, 99.

15. Behrens, U. J., Salvatore Vernace, Fiorenzo Paranetto:
Studies on "Liver-Specific" Antigens.
II. Detection of Serum Antibodies to Liver and Kidney Cell Membrane Antigens in Patients with chronic Liver Disease.
Gastroenterology, 1979, 77, 1053 - 1061.

16. Mc Farlane, I. G., Barbara M. Wojcicka, Zucker, G. M., Eddlestone, A. L. W. F., Williams, R.: Purification and characterization of human liver-specific membrane lipoprotein (LSP). Clin. exp. Immunol., 1977, 27, 381 - 390.

17. Hütteroth, T. H., Meyer zum Büschenfelde, K. H.: Clinical Relevance of the Liver-Specific-Lipoprotein. Acta Hepato-Gastroenterology, 1978, 25, 243 - 253.

18. Manns, M., Meyer zum Büschenfelde, K. H., Hess, G.: Autoantibodies against liver-specific membrane lipoprotein in acute and chronic liver diseases. Studies on organ-, species- and disease-specificity. Gut, 1980, 21, 955 - 961.

19. Shinichi Kakumu, M. D., Yoichi Arakawa, M. D., Hirotatsu Goji, M. D., Tomiji Kashio, M. D., Kazuaki Yata, M. D.: Occurrence and Significance of Antibody to Liver-Specific Membrane Lipoprotein by Double-Antibody Immunoprecipitation Method in Sera of Patients with Acute and Chronic Liver diseases. Gastroenterology, 1979, 76, 665 - 672.

20. Manns, M., W. Arnold, Meyer zum Büschenfelde, K. H., S. Nagai, H. Hoffmann:
Studies on Anti-LSP Autoantibodies in Acute and Chronic Non-B-Hepatitis. Evidence for the Lack of Anti-LSP in Non-A, Non-B Viral Hepatitis.
Klin. Wschr., 1981, 59, 685 - 689.

21. Thomson, A. D., Cochrane, A. M. G., Mc Farlane, I. G., Eddlestone, A. L. W. F., William, S. R.:
Lymphocyte cytotoxicity to isolated hepatocytes in chronic active hepatitis.
Nature (London), 1974, 252, 721.

22. R. Melicone, A. Peperas, D. Jensen, A. Alberti, I. G. Mc Farlane, A. L. W. F. Eddlestone, Roger Williams:
Anti-LSP-antibodies in acute liver disease.
Gut, 1982, 23, 603 - 607.

23. J. L. Dienstag, K. J. Isselbacher:
Liver specific Protein: More Questions than Answers.
New Engl. J. Med., 1978, 299, No. 1, 40 - 42.

24. Meyer zum Büschenfelde, K. H.:
Heterogenity of Immune Reactions in Inflammatory

Liver Diseases.
Hepatology Review, 1st Quarter 1981.

25. A. L. W. F. Eddlestone and R. Williams:
Inadequate antibody response to HbsAg by suppressor-T-cell defect in development of active chronic hepatitis.
Lancet, 1974, 2, 1543 - 1545.

26. Tsantoulas D., Perperas A., Portman B., A. L. W. F. Eddlestone, Roger Williams:
Antibodies to a human liver membrane lipoprotein (LSP) in primary biliary cirrhosis.
Gut, 1980, 557 - 560.

27. U. Tage-Jensen, W. Arnold, O. Dietrichson, F. Hardt, U. Hopf, K. H. Meyer zum Büschenfelde, J. O. Nielson:
Liver cell membrane autoantibody specific for inflammatory diseases.
Brit. Med. J., 1977, 1, 206 - 208.

28. Ursula J. Behrens, Fiorenzo Paronetto:
Studies on "Liver-Specific" Antigens.
I. Evaluation of the Liver Specificity of "LSP" and "LP-II".
Gastroenterology, 1979, 77, 1045 - 1052.

29. Mc Farlane I. G., Wojcicka, B. M., R. Williams:
Antigens of the human liver.
Clin. exp. Immunol., 1980, 40, 1 - 7.

30. Meyer zum Büschenfelde, K. H., M. Manns,
T. H. Hütteroth, U. Hopf, W. Arnold:
LM-Ag and LSP - two different target antigens
involved in the immunpathogenesis of chronic
active hepatitis.
Clin. exp. Immunol., 1979, 37, 205 - 211.

31. Manns M., K. H. Meyer zum Büschenfelde:
Fractionation of the liver membrane lipo-
protein (LSP) and characterization of its
antigenic determinants by autoantibodies of
a heterologous antiserum.
Gut, 1982, 23, 14 - 20.

32. M. Manns, K. H. Meyer zum Büschenfelde, T. H.
Hütteroth, U. Hopf:
The liver specific protein: Evidence for species-
specific and non-species-specific determinants.
J. Clin. Lab. Immunol., 1980, 3, 9 - 13.

33. U. Hopf, K. H. Meyer zum Büschenfelde, J. Freu-
denberg:

Liver specific Antigens of different species.
II. Localization of a Membrane Antigen at
Cell Surface of Isolated Hepatocytes.
Clin. exp. Immunol., 1974, 16, 117 - 124.

34. N. Lebwohl, M. A. Gerber:
Characterization and demonstration of human liver
specific protein (LSP) and apo-LSP.
Clin. exp. Immunol., 1981, 46, 435 - 442.

35. Oliver H. Lowry, Nira J. Rosebrough, A. Lewis
Farr, Rose J. Randall:
Protein Measurement with the Folin-Phenol-Reagent.
J. Biol. Chem., 1951, 193, 265 - 275.

36. Stahl, E.:
Dünnschichtchromatographie.
2. Auflage, 1967, S. 361 ff und 374 ff.
Springer Verlag, Heidelberg.

37. Roschlau, B., Gruber:
Cholesterol.
9th Int. Cong. on Clin. Chemistry, Toronto, 1975,
Abstr. No. 1.

38. Trinder:
Cholesterol.
Ann. Clin. Biochem., 1969, 6, 24.

39. A. W. Wahlfeld in H. U. Bergmeyer:
Methoden der enzymatischen Analyse.
3. Auflage, 1974, Bd. II, Verlag Chemie, Weinheim.

40. Kushiro, Takano, Fukui.
Jap. J. Clin. Path., 1971, 15, 191 ff.

41. C. H. Fiske, Y. P. Subbarow:
The colorometric Determination of Phosphorous.
J. Biol. Chem., 1925, 66, 375 - 400.

42. Helmut K. Mangold in Egon Stahl:
Dünnschichtchromatographie.
2. Aufl., 1967, S. 371ff, Springer Verlag, Heidelberg.

43. Affinity Chromatography, principles & methods,
Pharmacia Fine Chemicals, p. 52 - 57.

44. Bedienungsanleitung für Hochleistungsrotor
60 Ti der Fa. Beckmann:
H. Reckert, Dr. P. Schnieder:
Berechnung von CsCl-Gradienten bei isopyknischer
Ultrazentrifugation.

45. Carl R. Merril, David Goldmann, Margaret L. van
Keuren:

Simplified silver protein detection and image enhencement methods in polyacrylamid gels. Electrophoresis 3, 17 - 23, 1982.

46. Jones, O. C., J. M. Price:
Some methods of electron microscopic visualization of lipoproteins in plasma and chyle.
J. Histochem. Cytochem. 16, 366, 1968.

47. James E. Rothmann and John Lenard:
Membrane Asymmetry.
Science 195, 743 - 753, 1977.

48. Mark S. Bretscher & Martin C. Raff:
Mammalian plasma membranes.
Nature, 258, 43 - 49, 1975.

49. Jüngst, D.:
Cholesterin im Urin - Grundlagen und klinische Bedeutung.
Habilitationsschrift an der Ludwigs-Maximilians-Universität München, 1982.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. D. Juengst bin ich für die Anregung, die Themenstellung und Betreuung für diese Arbeit sowie die Übernahme des Referates tiefen Dank schuldig.

Herrn Direktor Professor Dr. med. G. Paumgartner schulde ich ebenfalls Dank für die Arbeitsmöglichkeit in seiner Klinik und für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Priv. Doz. Dr. Siess aus dem Institut für Diabetesforschung in München am Krankenhaus Schwabing danke ich für die großzügige Unterstützung bei der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Desweiteren möchte ich mich bei den Damen im Labor für ihre freundliche Hilfestellung bedanken.

LEBENSLAUF

Am 15. November 1957 bin ich in Straubing als zweiter Sohn des Kaufmanns Blumenstingl Johann und seiner Ehefrau Mathilde geboren.

Mein Vater verstarb 1970.

Von 1964 bis 1970 besuchte ich die Volksschule in Straubing, wechselte dann auf die Realschule, die ich 1974 mit dem Zeugnis der Mittleren Reife verließ, um anschließend im Ludwigsgymnasium Straubing 1977 das Abitur zu machen.

Im Anschluß daran leistete ich 10 Monate meiner Grundwehrdienstzeit ab.

Im Sommersemester 1978 begann ich dann das Studium der Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität in München. Dort blieb ich bis Studienende und absolvierte im April 1984 mit dem Staatsexamen.

Seit Anfang Mai 1984 leiste ich den Rest meiner Grundwehrdienstzeit als Stabsarzt ab.